

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

（分担）研究報告書

分担研究課題 「大都市圏の環境水調査および薬剤耐性菌の解析」

研究分担者 山口 進康 大阪健康安全基盤研究所 衛生化学部食品化学課 課長

研究要旨

抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性菌の分布拡大とヒトへのリスクが懸念される中、環境中における薬剤耐性や抗菌薬のサーベイランス手法が確立されていないことから、本邦の環境中の薬剤耐性菌及び残留抗菌薬の実態は不明である。したがって、環境がヒト及び動物に与えるリスクの評価、薬剤耐性機序や伝播経路の解明につながるデータの収集が急務である。

そこで本分担研究では、以下の項目について調査研究を行った：

- 1) 全国レベルの環境 AMR モニタリングのため、地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所に対して研究協力を依頼した。その結果、31 地方衛生研究所から協力が得られ、2024 年 8 月～9 月に下水処理場放流水及び流入水を、2025 年 1 月～2 月に下水処理場放流水を収集できた。各試料水は各地衛研において前処理を行い、国立感染症研究所（分担・菅原）において放流水中のメタゲノム解析による薬剤耐性因子の検出、国立感染症研究所（分担・久恒）において流入水からのバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）の分離、大阪医科薬科大学（分担・東）において放流水中の残留抗菌薬量の測定が行われた。
- 2) 大阪府内において、下水処理場からの放流水及びその放流水が流入する河川水を計 4 地点から採取し、環境 AMR モニタリング用の試料調製及び薬剤耐性菌の分離を試みるとともに、薬剤耐性遺伝子の検索を行った。その結果、下水処理場からの放流水及びその流入後の河川から、各種 β -ラクタマーゼ産生遺伝子を保有する腸内細菌科細菌を分離した。

研究協力者：

安達 史恵
大阪健康安全基盤研究所
衛生化学部生活環境課 主任研究員

河原 隆二
大阪健康安全基盤研究所
微生物部細菌課 総括研究員

小川 恵子
北海道立衛生研究所
感染症センター 感染症部細菌グループ

落合 崇浩
北海道立衛生研究所
感染症センター 感染症部細菌グループ

佐藤 凜
北海道立衛生研究所
感染症センター 感染症部細菌グループ

川端 結
北海道立衛生研究所
感染症センター 感染症部細菌グループ

高橋 志保
秋田県健康環境センター
保健衛生部細菌チーム 主任研究員

織戸 優
茨城県衛生研究所
細菌部 主任

塚越 博之
群馬県衛生環境研究所
保健科学係長

長埜 朗夫
千葉市環境保健研究所
健康科学課

湯澤 栄子
川崎市健康安全研究所
呼吸器・環境細菌担当

高橋 奈緒美
静岡県環境衛生科学研究所
微生物部

高橋 美穂
静岡市環境保健研究所
微生物学係 主任獣医師

鈴木 麻希
浜松市保健環境研究所
微生物検査グループ 副技監

齋藤 典子
愛知県衛生研究所
生物学部細菌研究室 室長

柴田 伸一郎
名古屋市衛生研究所
微生物部長

近藤 博文
京都府保健環境研究所
水質・環境課 課長

山田 宜衛
姫路市環境衛生研究所
臨床・微生物担当 技術主任

足立 有彩
奈良県保健研究センター
細菌担当 技師

川合 裕子
さいたま市健康科学研究センター
環境科学課 主任

松本 裕子
横浜市衛生研究所
微生物検査研究課 上席研究員

柳本 恵太
山梨県衛生環境研究所
微生物部細菌科 主任研究員

鈴木 史恵
静岡市環境保健研究所
微生物学係 副主幹

小野田 早恵
静岡市環境保健研究所
微生物学係 主任薬剤師

野田 万希子
岐阜県保健環境研究所
保健科学部 主任専門研究員

三木 卓也
名古屋市衛生研究所
微生物部 研究員

和田 拓樹
京都府保健環境研究所
細菌・ウイルス課 主任

有川 健太郎
神戸市健康科学研究所
第2衛生研究部 副部長

井ノ上 美紅
奈良県保健研究センター
細菌担当 主任主事

高木 文徳
和歌山県環境衛生研究センター
衛生研究部微生物グループ 主査研究員

池端 孝清 和歌山市衛生研究所 微生物学班 班長	西川 政喜 和歌山市衛生研究所 微生物学班 技術副主任
平塚 貴大 広島県立総合技術研究所保健環境センター 保健研究部 任研究員	木本 直哉 山口県環境保健センター 保健科学部生物・細菌グループ専門研究員
村田 祥子 山口県環境保健センター 保健科学部生物・細菌グループ 専門研究員	大塚 仁 山口県環境保健センター 保健科学部生物・細菌グループ 専門研究員
松本 純子 愛媛県立衛生環境研究所 衛生研究課 微生物試験室長	カール 由起 福岡県保健環境研究所 保健科学部病理細菌課 主任技師
重村 洋明 福岡県保健環境研究所 保健科学部病理細菌課 専門研究員	中村 悦子 北九州市保健環境研究所 微生物部門 主任
中島 向南 佐賀県衛生薬業センター 微生物課 技師 (現：佐賀県庁 薬務課)	原田 誠也 熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部 研究員
矢野 浩司 宮崎県衛生環境研究所 微生物部 主任	
他、地方衛生研究所 2 機関の研究員 4 名	

A. 研究目的

近年、医療施設・市中・家畜のみならず、世界各国の土壌・河川等の環境からも薬剤耐性 (Antimicrobial Resistance: AMR) 因子が検出され、環境での対策を含めたワンヘルス・アプローチが注目されている。

抗菌薬の環境汚染による薬剤耐性菌の分布拡大とヒトへのリスクが懸念される中、環境中における薬剤耐性や抗菌薬のサーベイランス手法が確立されていないことから、本邦の環境中の薬剤耐性菌及び残留抗菌薬の実態も不明である。したがって、環境がヒト及び動物に与えるリスクの評価、薬剤耐性機序や伝播経路の解明につながるデータの収集が急務である。

そこで、以下の研究を計画した；

1) 地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所に対して研究協力を依頼し、全国レベルの環境 AMR モニタリングを行う。

2) 大阪府内において、下水処理場からの放流水及びその放流水が流入する河川水を採取し、メタゲノム解析による薬剤耐性因子の検出を行うとともに、薬剤耐性菌の分離を行う。分離株について詳細な解析を行い、カルバペネム耐性腸内細菌目細菌 (CRE) についてはゲノム解析を実施し、市中分離株や海外関連株との関連性について検討する。

B. 研究方法

1. 環境水中の薬剤耐性菌及び耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスの実施

環境水中の薬剤耐性菌及び耐性遺伝子の全

全国的なサーベイランスを行うために、地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活かして、国内各地の地方衛生研究所（地衛研）に研究協力を呼び掛けた。その結果、計 31 機関から研究協力を得ることができ、環境水のサンプリング及び薬剤耐性遺伝子のメタゲノム解析用、残留抗菌薬量の測定用、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）の分離用の各試料調製を依頼した。

環境水のサンプリングに先立ち、サンプリング及び前処理に必要な物品として、採水用ボトル、フィルター付きろ過容器、フィルター裁断用のメス、凍結送付用のマイクロチューブを各研究協力機関に送付した。

環境水のサンプリングは夏期：2024 年 8 月～9 月及び冬期：2025 年 1 月～2 月にかけて行われ、薬剤耐性遺伝子のメタゲノム解析及び残留抗菌薬量の測定のために下水処理場の放流水（あるいは処理水の放流口にできる限り近い地点の表層河川水）が、VRE の分離のために流入水が採取された。なお、水量の増える雨天時や雨天後の採水を避けた。

サンプリングにあたっては、採水箇所の位置情報、日時、水温、気温等の記録とともに、採水地点及び周辺の写真撮影を依頼した。また、下水処理場に関する情報として、1 日平均の処理能力、処理方法、管理する区域の人口、処理区の範囲等について、調査・情報提供を依頼した。

試料調製にあたっては、研究協力機関の間で差が生じないように、プロトコルを配布し、採水、前処理及び試料調製が統一された方法で行われるよう依頼した。調製した試料は冷凍宅配便で国立感染症研究所に送付されメタゲノム解析が、冷凍宅配便で大阪健康安全基盤研究所に送付された後、大阪医科薬科大学で残留抗菌薬量の測定が行われた。なお、冷凍宅配便での発送までの間、試料は冷凍で保管するよう依頼した。VRE 分離用の試料は、冷蔵宅配便で国立感染症研究所に送付された。

2. 大阪府内における環境水中の薬剤耐性遺伝子の把握及び薬剤耐性菌の分離

本研究班で実施している「メタゲノム解析による薬剤耐性因子検出」のプロトコルに従い、サンプリング及び試料の調製を行った。

大阪府内の下水処理場 2 地点の放流水及びその下流河川 2 地点において、2024 年 8 月及び 2025 年 2 月に採水を行った。なお、河川でのサンプリングは、それぞれの下水処理場からの放流水が流入した地点で行い、分離培養のみに用いた。メタゲノム用の試料水 500 mL は 0.2 μm 孔径のフィルターを用いてろ過し、細菌以上の大きさの浮遊物を回収した。このフィルターを滅菌したメスで 1/4 に裁断した後、マイクロチューブに入れて、国立感染症研究所に冷凍宅配便で送付した。

培養法における前処理方法は、2021 年度に検討した方法を用いて実施した。すなわち、試料水 400～500 mL を 0.45 μm 孔径のフィルターでろ過し、フィルターを CHROMagar ECC を用いて $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ で約 20 時間培養後、フィルター上のコロニーをかきとり、滅菌生理食塩水に懸濁させた。次に、培地上のコロニー数が約 30～300 となるようにマクファーランドスタンダードを用いて菌液を調製後、以下 1)～2) の 2 種類の培地に塗抹した：

1) 0.25 $\mu\text{g/mL}$ の MEPM 及び 70 $\mu\text{g/mL}$ の ZnSO_4 を含有する CHROMagar ECC (M-ECC)

2) 1 $\mu\text{g/mL}$ の Cefotaxime (CTX) を含有する CHROMagar ECC (CTX-chromo)

分離したコロニーはマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS) を用いて菌種同定を行った。その後、ドライプレート（栄研化学）を用いて、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の標準法 (M100, 34th ed.) に従い、微量液体希釈法を用いて最小発育阻止濃度 (MIC) を決定した。また、ディスク拡散法を用いたメタロ- β -ラクタマーゼや基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (extended-spectrum β -lactamase ; ESBL) 等の産生鑑別試験及び、カルバペネマーゼ産生確認試験 (Modified Carbapenem Inactivation Method; mCIM) を行った。

得られた株については、PCR による耐性遺伝子のスクリーニング及びシーケンスによるサブタイプの検索を行った。

また、得られた株の詳細を明らかにするため、NucleoBond HMW DNA (Takara Bio) で

DNA 抽出後、全ゲノム解析をナノポアシーケンサー MinION(Oxford Nanopore technologies)により実施中である。

C. 研究結果

1. 環境水中の薬剤耐性菌及び耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスの実施

全国 31 の地方研究衛生研究所においてサンプリングが実施され、得られた試料の解析は国立感染症研究所（分担研究者：菅原、久恒）及び大阪医科薬科大学（分担研究者：東）で実施した。解析結果は採水地点等が判明しないよう、匿名で処理され、総括したデータについて考察がなされた。

2. 大阪府内における環境水中の薬剤耐性遺伝子の把握及び薬剤耐性菌の分離

1) 薬剤耐性菌の分離

培養法を用いて、環境水中の薬剤耐性菌調査を 2024 年 8 月及び 2025 年 2 月に実施した結果、各種 β ラクタマーゼ産生遺伝子を保有する腸内細菌目細菌を分離した。

カルバペネム耐性腸内細菌目細菌(CRE)は M-ECC 培地から 4 株分離された。遺伝子のスクリーニング及びシーケンスの結果、*bla*_{NDM-1} 保有 *E.coli* が 2 株、*bla*_{NDM-5} 保有 *E.coli* が 2 株であった。分離した株の概要を表 1 に示す。

ESBL 産生株（CTX-M 型陽性のみ）は 2024 年 7 月において 21 株分離され、そのうち 16 株は CTX-chromo から、残り 5 株は M-ECC 培地から分離された。2025 年 2 月においては 23 株分離され、そのうち 20 株は CTX-chromo から、残り 3 株は M-ECC 培地から分離された。菌種別の PCR による遺伝子型のスクリーニングの結果概要を表 2 に示す。菌種は *E.coli*, KpnC (*K. pneumoniae* complex) が約 90%を占めた。CTX-M-1 型を保有している 30 株のうち、CTX-M-1 型を単独で保有している株が 9 株、CTX-M-1 型+SHV、CTX-M-1 型+TEM、CTX-M-1 型+SHV+TEM がそれぞれ 6、7 及び 8 株あった。CTX-M-9 型は単独保有株が 9 株、CTX-M-9+ TEM 型が 4 株であった。

分離された ESBL 産生株の CTX-M-9 型のうち *bla*_{CTX-M-14} 保有株が 9 株、*bla*_{CTX-M-27} 保

有株が 3 株であった（1 株は未同定）。

全 8 試料における ESBL 及びヒト由来と想定されるカルバペネマーゼ産生株の陽性率はそれぞれ 100%、37.5%となった。

D. 考察

環境水中の薬剤耐性菌及び耐性遺伝子に関する全国的なサーベイランスの実施にあたっては、大阪を含めた計 32 機関により国内広範囲のデータを収集することができた。

培養法における前処理方法として、2021 年度より検討を開始した方法を用いて、分離培養を実施した。全 8 試料において ESBL 及びヒト由来と想定されるカルバペネマーゼ産生株の陽性率はそれぞれ 100%、37.5%となり、2021～2023 年度の結果と大きな変化はなく、現在の医療機関での検出状況と合致しているのではないかと考えられた。

分離された CRE は NDM-1 型カルバペネマーゼ産生 *E.coli*、NDM-5 型カルバペネマーゼ産生 *E.coli* であったが、NDM-5 型カルバペネマーゼ産生菌はこれまでの調査（2021-2023 年度）においても、*E.coli*、*K. pneumoniae*、*C. braakii* と様々な菌種から計 5 株分離されている。また上記 5 株のうち 4 株においては、世界的な *bla*_{NDM-5} の蔓延に寄与している IncX3 プラスミド上に *bla*_{NDM-5} が検出されており、またそれらが保有するプラスミドの相関性が高かった。今のところ、国内で感染例が少ない NDM-5 型カルバペネマーゼ産生菌が環境から分離されている原因としては、海外からの渡航者を介して持ち込まれている可能性が高いと考えているが、引き続き、今年度分離された株についてもゲノム解析等を行い、その由来について明らかにしていく必要がある。一方、これまでの調査で比較的多く分離していた *bla*_{GES-24} 保有株は 2024 年度の調査では分離されなかった。

ESBL 産生株について、CTX-M 型遺伝子の保有状況を調べた結果、約 68%が CTX-M-1 型、約 30%が CTX-M-9 型であった。現在の本邦の医療機関における CTX-M 型の主流は CTX-M-9 型であり¹⁾、また、日本の健常者における ESBL 産生大腸菌の調査²⁾においても、その遺伝子型の内訳は CTX-M-1 型が 21.7%、CTX-M-9 型が 59.4%という結果で医

療機関の割合とやや近くなっており、今回の環境水からの検出状況とは異なっていた。

アジアにおいては、CTX-M-14 (CTX-M-9 型)及び CTX-M-55(CTX-M-1 型)が多く、ヨーロッパでは CTX-M-15(CTX-M-1 型)が多いといった傾向があり³⁾、今回の調査で CTX-M-1 型の分離割合が 68%と高かったことから、CRE と同様に海外からの渡航者を介して、持ち込まれている可能性が高いとも考えられる。一方で、今回遺伝子型を同定した CTX-M-9 型のうち 75%が *bla*_{CTX-M-14} であり、*bla*_{CTX-M-14} は日本の医療機関や健康人から頻繁に分離されていることから、ESBL 産生株についても、さらに詳細に解析する必要がある。

全 8 試料における ESBL 及びヒト由来と想定されるカルバペネマーゼ産生株の陽性率は、医療機関の状況を示していると考えられたが、国内で感染例が少ない NDM-5 型カルバペネマーゼ産生菌が分離数は少ないものの、高頻度に検出されている、また ESBL 産生株の遺伝子型の保有状況について、医療機関とはやや異なった結果であったため、今後、分離株を詳細に解析し、その由来について明らかにする必要があると考えられた。

E. 結論

本分担研究では、大阪府内の環境水を対象として、薬剤耐性菌及び耐性遺伝子に関する情報を収集した。

環境水中の薬剤耐性菌及び耐性遺伝子に関して、全国的なサーベイランスに取り組んだ。これらのサーベイランスにより、環境中の薬剤耐性菌及び耐性遺伝子の現状を把握するためのデータが得られ、その実態を明らかにするためのデータを蓄積できた。

薬剤耐性菌の分離において、2021 年度から検討している、フィルターを用いて前培養後、培養する方法がより効率的に目的とする菌を検出できる方法であることが示唆された。分離培養で得られる株は、CRE と比較すると ESBL 株が多く、全検体から検出されていた。これは、現在の医療機関での検出状況と一致しており、培養法を用いた薬剤耐性菌の分離は、地域の状況を把握するための指標となり得るのではないかと考えられた。一方、

CRE の詳細な解析により、海外由来と考えられる遺伝子を保有する株も分離されているため、放流水から分離される株が地域の感染状況の指標となり得るかについては、さらなるデータの蓄積が必要である。また、CRE だけではなく、ESBL 産生菌についても詳細に解析し、総合的に判断する必要があると考えられた。

海外由来と考えられる遺伝子が今後定着及び拡散する可能性も否定できないことから、継続したモニタリングが重要と考えられた。

これらのデータは、本邦の環境中の薬剤耐性因子や抗微生物薬がヒト及び動物へ与える影響についてリスク評価を行うための基盤となるものであり、薬剤耐性 (AMR) アクションプランの目標達成に貢献できるものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) Gomi R, Adachi F. Quinolone Resistance Genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxAB*, and *qepA* in Environmental *Escherichia coli*: Insights into Their Genetic Contexts from Comparative Genomics. *Microb Ecol*. 2025 Feb 17;88(1):6

その他発表

1) 安達史恵, 原 直寛, 井澤恭子, 山本かおり, 柿本健作, 左近直美, 元岡大祐, 河原隆二: カルバペネム耐性腸内細菌目細菌の大都市下水サーベイランスの試み. 第 53 回薬剤耐性菌研究会, 志摩 (2024)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

参考文献

1) 北川恵美子ら, 石川県における薬剤耐性菌の保有状況の把握. 石川県保健環境センター研究報告書第 59 号, 1-7 (2022)
2) Nakane K., Kawamura K., Goto K.,

Arakawa Y. Long-term colonization by bla(CTX-M)-harboring *Escherichia coli* in healthy Japanese people engaged in food handling. Appl Environ Microbiol., 82 (6): 1818-1827 (2016)

3) Yu K., Huang Z., Xiao Y., Gao H., Bai X., Wang D. Global spread characteristics of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases: A genomic epidemiology analysis, Drug Resistance Updates, 73: 101036 (2024)

表 1 カルバペネム耐性株の概要

菌種	遺伝子型	由来	MIC (μg/mL)								
			PIPC	CMZ	CAZ	CTX	AZT	IPM	MEPM	AMK	CPFX
<i>E. coli</i>	NDM-1	放流水	>64	4	>16	>16	<0.5	2	2	4	2
<i>E. coli</i>	NDM-5	下流河川水	>64	32	>16	>16	<0.5	4	>8	2	>4
<i>E. coli</i>	NDM-1	下流河川水	>64	64	>16	>16	<0.5	2	1	4	0.5
<i>E. coli</i>	NDM-5	下流河川水	>64	32	>16	>16	<0.5	4	8	>64	1

PIPC, piperacillin; CMZ, Cefmetazole; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; AZT, aztreonam; IPM, imipenem; MEPM, meropenem; AMK, amikacin; CPFX, ciprofloxacin

表 2 ESBL 産生株の菌種別遺伝子型保有状況

	<i>E. coli</i>	KpnC	KoxC	CfrC	Total
CTX-M-1	7	2			
CTX-M-1,SHV		6			
CTX-M-1,TEM	4		1	2	30
CTX-M-1,TEM,SHV		8			
CTX-M-8,TEM	1				1
CTX-M-9	8			1	13
CTX-M-9,TEM	4				
Total	24	16	1	3	44

KpnC: *K. pneumoniae* complex, KoxC: *K. oxytoca* complex, CfrC: *C. freundii* complex